

## Bronchoskopia autofluorescencyjna w diagnostyce i leczeniu raka płuca

Autofluorescence bronchoscopy in diagnostics and treatment of the lung cancer

Piotr Donat, Rodryg Ramlau, Elżbieta Nowak, Aleksander Barinow-Wojewódzki

Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii im. Eugenii i Janusza Zeylandów w Poznaniu

Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska 2010; 7 (2): 166–169

### Streszczenie

Rak płuca jest najczęstszym nowotworem złośliwym na świecie i charakteryzuje się najwyższą umieralnością.

Jest przyczyną ok. 20% zgonów z powodu wszystkich chorób nowotworowych – średnio z powodu nowotworów płuca umiera 28% mężczyzn oraz 10% kobiet. Większość chorych poddanych procesowi diagnostycznemu jest w okresie zaawansowanej postaci choroby.

Pacjenci z rozpoznaniem rakiem płuca mają stosunkowo małe szanse na skuteczne i trwałe wyleczenie. Rokowanie w raku płuca pozostaje niekorzystne.

Na powodzenie leczenia decydujący wpływ ma wczesne rozpoznanie choroby. Ryzyko zachorowania jest najwyższe w grupie osób palących, stąd tak ważna prewencja pierwotna, czyli zerwanie z nałogiem palenia.

Badania przesiewowe ukierunkowane są na wykrywanie wcześniejszych stanów zaawansowania raka płuca. W ostatnich kilkunastu latach nastąpił rozwój nowoczesnych metod diagnostycznych, w tym bronchoskopii autofluorescencyjnej.

W niniejszym artykule przedstawiono historię badań nad fluorescencją tkanek, zasady działania bronchoskopii autofluorescencyjnej oraz możliwości jej zastosowania w bronchologii.

**Słowa kluczowe:** rak płuca, bronchoskopia autofluorescencyjna.

### Wstęp

W krajach wysoko rozwiniętych choroby nowotworowe obok chorób układu krążenia są główną przyczyną zachorowań i zgonów. Wśród nowotworów złośliwych rak płuca zajmuje czołowe miejsce, stanowiąc aktualnie najczęściej występujący nowotwór złośliwy na świecie, charakteryzujący się najwyższą umieralnością. Roczna liczba nowych zdiagnozowanych chorych w Europie przekracza 200 tys. Rak płuca jest przyczyną ok. 20% zgonów wśród wszystkich nowotworów złośliwych – średnio 28% u mężczyzn oraz 10% u kobiet [1, 2].

### Abstract

Lung cancer is the most frequent malignant cancer in the world and it is characterized by the highest mortality rate. This type of cancer is the reason of about 20% of all deaths caused by cancerous diseases. On average, 28% of males and 10% of females die of lung cancer. The majority of ill people, who have undergone a diagnostic process, are considered to be at an advanced stage of this disease. Patients suffering from lung cancer have a relatively little chance of effective and permanent recovery. Prognosis of lung cancer remains disadvantageous.

Early diagnosis has a decisive impact on the success in treatment. The risk of incidence is the highest among smokers, therefore, the role of primary prevention, i.e. breaking the habit, is crucial here. The cancer screening is oriented to detect earlier stages of advanced lung cancer. In the last couple of years, the modern diagnostic methods have been developed including autofluorescence bronchoscopy.

The following review shows case studies related to fluorescence of cells, the effects of autofluorescence bronchoscopy as well as possibilities of its usage in bronchology.

**Key words:** lung cancer, bronchoscopy, autofluorescence.

Pomimo postępów medycyny w zakresie leczenia i diagnostyki oraz propagowania na szeroką skalę działań profilaktycznych niepokojącym zjawiskiem jest utrzymujące się niekorzystne rokowanie w raku płuca i brak poprawy przeżycia, szczególnie w dłuższej perspektywie czasowej.

### Bronchoskopia autofluorescencyjna

Zmiany przedinwazyjne dotyczące powierzchni nabłonka są zbyt małe, żeby mogły być identyfikowane w ramach dostępnych technik obrazowania, a także w większości

**Adres do korespondencji:** Piotr Donat, Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu, ul. Szamarzewskiego 62, 60-569 Poznań, tel. +48 61 665 42 62, e-mail: piotr-donat@wp.pl

przypadków w konwencjonalnej bronchoskopii. Ograniczenia klasycznej bronchoskopii w wykrywaniu wczesnych zmian nowotworowych były impulsem do rozwoju nowych technik diagnostycznych w bronchologii, w tym bronchoskopii autofluorescencyjnej.

Bronchoskopia autofluorescencyjna jest badaniem, które pozwala odróżnić tkankę prawidłową od zmian patologicznych, wykorzystując różnice we fluorescencji tkanek, co przekłada się na różnobarwny obraz w trakcie badania endoskopowego. Lycette i Leslie już w roku 1965 jako pierwsi donieśli o różnicy w świeceniu między tkanką prawidłową a nowotworową [3].

Zjawisko fluorescencji zachodzi na poziomie komórek i tkanek i związane jest z obecnością endogennych chromoforów, które charakteryzuje zdolność autofluorescencji po oświetleniu światłem o określonej długości fali na drodze pobudzenia atomów poprzez absorpcję dodatkowej energii niesionej przez fale elektromagnetyczne. Do naturalnych, zidentyfikowanych chromoforów zaliczamy m.in. tryptofan, kolagen, elastynę, porfiry, NADH i flawoidy. W drzewie oskrzelowym związki chromofobowe występują głównie w warstwie podnabłonkowej. Światło wzbudzające charakteryzuje wysoka energia oraz krótka długość fali, natomiast światło wzbudzone niska energia oraz długa fala światła, najdłuższa dla porfiry 630/690 nm, związków flawinowych 520 nm oraz NADH 470 nm. W roku 1993 wprowadzony został system endoskopii fluorescencyjnej indukowanej światłem (*light induced fluorescence endoscope* – LIFE). System generuje widzialne światło niebieskie, którego źródłem jest laser helowo-kadmowy. Po oświetleniu dróg oddechowych laserem wykorzystuje się zjawisko słabszej samoistnej emisji przez obszary zmienionej błony śluzowej widocznej w paśmie barwy czerwonej, w porównaniu z prawidłową błoną śluzową emitującą widmo zielone. Kamera podłączona do endoskopu rejestruje emitowaną fluorescencję, a cyfrowy analizator obrazu przetwarza fale w obraz widoczny na monitorze. Możliwe jest szybkie przełączenie trybu pracy bronchoskopu między światłem białym i niebieskim [4].

Przyczyny osłabienia samoistnej emisji światła fluorescencyjnego wynikają z zaburzeń morfologicznych oraz biochemicznych tkanek, będących następstwem toczącego się procesu chorobowego w błonie śluzowej. Najczęstszym zaburzeniem morfologicznym jest pogrubienie nabłonka w przebiegu transformacji nowotworowej, ograniczające dostępność światła wzbudzającego do warstwy podnabłonkowej o największej koncentracji cząsteczek fluorujących. Do innych przyczyn osłabienia autofluorescencji zaliczamy patologiczne unaczynienie guza, czego wynikiem jest absorpcja światła zielonego przez hemoglobinę, oraz redukcję endogennych fluoroforów w komórce nowotworowej, jako wynik metabolizmu komórkowego.

Oslabienie samoistnej emisji może być spowodowane nie tylko przez zmiany patologiczne związane z procesem kancerogenezy, ale także przez zalegającą wydzielinę, wynaczynioną krew, naczynia krwionośne, stan zapalny, inkrustację pyłem węglowym, zmiany bliznowate czy rzeźbę śluzówki. Badanie endoskopowe powinno być wykonane

starannie, przy dobrej współpracy z chorym, w celu jak najmniejszej traumatyzacji błony śluzowej.

Bronchoskopia autofluorescencyjna nie spełnia jednoznacznie kryteriów badania przesiewowego, ale w określonych sytuacjach klinicznych może być metodą bardzo użyteczną, nierzadko wpływającą na dalsze postępowanie lecznicze. Przykładem mogą być chorzy przed planowanym zabiegiem z powodu raka płuca. Badania m.in. van Rensa oraz Pierarda pokazały, że wykonanie bronchoskopii autofluorescencyjnej krótko przed planowanym zabiegiem pozwoliło wykryć u niektórych chorych przypadkowe zmiany o charakterze raka *in situ* lub raka inwazyjnego (rak synchroniczny). Według różnych źródeł przedstawianych w literaturze, powyższe zmiany występują w przedziale od 0,7 do 15% [4, 5]. Występowanie zmian przedinwazyjnych czy raka inwazyjnego o charakterze guza synchronicznego, a także drugiego pierwotnego guza u osób po doszczętnym zabiegu operacyjnym, po części można tłumaczyć obecnością wieloogniskowych zmian w błonie śluzowej, określanych jako pola kancerogenezy (*fields of cancerization*), które histologicznie odpowiadają metaplastji lub dysplazji różnego stopnia, zawierając m.in. mutacje genów supresorowych i onkogennych [5, 6].

Kontynuowanie palenia papierosów czy stałe narażenie na czynniki środowiskowe zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju dalszych etapów kancerogenezy z rakiem inwazyjnym włącznie. Przypadkowe wykrycie ogniska synchronicznego przed planowanym zabiegiem może wpływać na ostateczną zmianę planu leczenia. Wykryte zmiany chorobowe są najczęściej małe, dlatego w koncepcji leczenia powinno rozważyć się połączenie planowanego zabiegu operacyjnego z terapią śródoskrzelową, napromienianiem lub dodatkową resekcją, w zależności od doświadczenia oraz możliwości leczniczych danego ośrodka. Van Rens oraz Pierard wskazują na potrzebę wykonania bronchoskopii autofluorescencyjnej w stosunkowo krótkim czasie przed planowanym zabiegiem chirurgicznym u chorych po pełnym stopniowaniu procesu chorobowego [5, 7].

Chorzy operowani z powodu raka płuca to szczególna grupa osób, która narażona jest na zwiększone ryzyko rozwoju drugiego pierwotnego raka zgodnie z koncepcją wieloogniskowości zmian kancerogenezy. Szczególnie dotyczy to osób, które kontynuują palenie po leczeniu operacyjnym. Ryzyko zachorowania szacuje się na 1–3% w pierwszym roku po zabiegu, natomiast szczyt zachorowania przypada w okresie od 3 do 8 lat po leczeniu operacyjnym. Połowa chorych z rozpoznaniem drugim pierwotnym rakiem płuca poddana jest ponownie leczeniu operacyjnemu [8]. W przypadku braku możliwości wykonania reoperacji można rozważyć u tych chorych leczenie śródoskrzelowe, takie jak terapię fotodynamiczną lub brachyterapię, pod warunkiem wczesnego wykrycia zmiany chorobowej. Bronchoskopia autofluorescencyjna jest badaniem, które przynosi wymierne korzyści w tej grupie chorych jako narzędzie monitoringu, umożliwiając wczesną detekcję zmian patologicznych i podjęcie skutecznego leczenia.

Kolejną grupą, u której bronchoskopia autofluorescencyjna umożliwia wykrycie i zlokalizowanie zmian patolo-

gicznych, są chorzy z obecnością komórek atypowych lub nowotworowych w badaniu cytologicznym płwociny, bez uchwytanych zmian w obrazie radiologicznym. Konwencjonalna bronchofiberoskopia uwidacznia zmiany nowotworowe jedynie w 29% przypadków, natomiast zastosowanie bronchofiberoskopii autofluorescencyjnej w drugim etapie badania pozwala znacznie zwiększyć możliwość lokalizacji zmiany nowotworowej [9].

Brak aktualnie dostępności badania w rozumieniu profilaktyki wtórnej nie pozwala badać pracowników narażonych na związki karcenogenne w ramach badań przesiewowych.

Pierwsze europejskie wieloośrodkowe badanie z randomizacją przeprowadzone przez Haussingera, ogłoszone w 2005 r. pokazało, że połączenie bronchoskopii konwencjonalnej z autofluorescencyjną pozwoliło podnieść wskaźnik rozpoznawania zmian przedinwazyjnych w stosunku do badania wyłącznie w świetle białym. Używając różnych systemów autofluorescencji, poddano analizie 1173 osoby po 40. r.ż., palaczy papierosów. Z badania wykluczono chorych z potwierdzoną chorobą inwazyjną. Najwyższy wskaźnik zmian przedinwazyjnych był stwierdzany u chorych z nieprawidłowym badaniem cytologicznym płwociny oraz z prawidłowym obrazem radiologicznym i wynosił 11,1%, następnie chorzy po zabiegu operacyjnym z powodu raka płuca – 6,7% oraz chorzy z klinicznym lub radiologicznym podejrzeniem raka płuca – 4,6%. Nie stwierdzono zmian przedinwazyjnych u chorych z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc lub narażonych na czynniki zawodowe [10, 11]. W innym badaniu Sato i wsp. w populacji osób będących ciężkimi palaczami z nieprawidłowym badaniem cytologicznym wykazali nadzwyczaj wysoki odsetek zmian dysplastycznych, który wynosił w przybliżeniu 80%, identyfikując głównie zmiany o charakterze dysplazji stopnia małego [12]. Wskaźnik rozpoznawania zmian przedinwazyjnych był oceniany również w badaniu Paris i wsp. U 241 chorych z wysokim ryzykiem dla raka płuca według kryteriów IASLC, wskaźnik rozpoznawania zmian przedinwazyjnych wysokiego stopnia wyniósł 9% i zależał od liczby czynników ryzyka dla raka płuca w odniesieniu do pojedynczego chorego [13].

Kennedy, dokonując przeglądu opublikowanych doniesień dotyczących wykorzystania bronchoskopii autofluorescencyjnej w diagnostyce zmian przedrakowych i wczesnych postaci raka, stwierdził, że bronchoskopia autofluorescencyjna jest 2,7-krotnie bardziej czuła od bronchoskopii konwencjonalnej w zmianach śródnamłonkowych oraz 6,3-krotnie bardziej czuła po włączeniu do analizy zmian inwazyjnych [14]. Zaletą bronchoskopii autofluorescencyjnej jest wysoka czułość metody w wykrywaniu zmian odpowiadających neoplazji śródnamłonkowej, natomiast stosunkowo niska swoistość, czyli zdolność metody do dokładnej identyfikacji tych osób, które nie chorują [4].

*The American College of Chest Physicians* rekomenduje bronchoskopię autofluorescencyjną do monitorowania zmian przedinwazyjnych typu dysplazji dużego stopnia oraz raka *in situ* [15, 16]. Rozróżnienie zmian przedinwazyjnych o potencjalnej złośliwości w stosunku do zmian ulegających

regresji lub stabilizacji jest zagadnieniem złożonym. Banerjee, analizując badania poświęcone zagadnieniu zmian przedinwazyjnych na przestrzeni kilkunastu lat, wykazał, że w kategorii zmian wysokiego stopnia, do których zaliczamy łącznie zmiany typu dysplazji dużego stopnia oraz *carcinoma in situ*, stosunek zmian, które uległy dalszej progresji, do zmian, które uległy cofnięciu, był porównywalny. Natomiast zmiany o charakterze dysplazji średniego stopnia miały stosunkowo niski wskaźnik progresji, nieprzekraczający 10% [10]. Zagadnieniu oceny biologicznych własności zmian dysplastycznych pod kątem możliwości progresji w raka z wykorzystaniem bronchoskopii autofluorescencyjnej poświęcone było badanie Hoshino, w którym oceniano aktywność wybranych biomarkerów w zmianach dysplastycznych biopłatów pobranych w trakcie bronchoskopii autofluorescencyjnej na początku badania oraz w badaniu powtórzonym po upływie 6 miesięcy. Autorzy wykazali wysoką aktywność telomerazy, indeksu mitotycznego Ki-67 oraz ekspresji p53 w komórkach, które nadal odpowiadały zmianom dysplastycznym lub uległy transformacji w komórki raka płaskonabłonkowego, sugerując, że powyższe biomarkery mogą być użyteczne w procesie śledzenia kancerogenezy [17]. Rola bronchoskopii autofluorescencyjnej jako metody monitorującej może znacząco wzrosnąć nie tylko z uwagi na badania kliniczne związane z procesem kancerogenezy, ale może pomóc w śledzeniu wyników leczenia śródoskrzelowego lub prowadzonej chemoprewencji. Bardzo ważną cechą morfologiczną zmian przedinwazyjnych jest integralność błony podstawnej zapobiegająca zmianom przerzutowym, co według niektórych autorów może dowodzić, że 90% 5-letnich przeżyć będzie można uzyskać na drodze leczenia zmian śródnamłonkowych [8, 18]. Przegląd wyników badań dokonanych przez Banerjee, a opublikowany w roku bieżącym, pokazuje, że u ponad 1/3 chorych z rakiem *in situ* poddanych terapii zmiany uległy dalszej progresji w kierunku raka inwazyjnego bez względu na metody leczenia. Stosunek chorych, u których zmiany uległy progresji, był podobny do grupy chorych poddanych tylko obserwacji. Liczba chorych z dysplazją dużego stopnia poddanych terapii w dostępnych badaniach była stosunkowo mała, stąd trudno o jednoznaczną ocenę. Wyniki badań pokazują, że miejscowe leczenie raka *in situ* może być niewystarczające do zahamowania progresji w kierunku raka inwazyjnego, wskazując na potrzebę poszukiwania nowych możliwości leczenia śródoskrzelowego i podkreślając znaczenie bronchoskopii autofluorescencyjnej w procesie monitorowania wyników leczenia [8]. Podobne zastosowanie może mieć bronchoskopia autofluorescencyjna w farmakologicznej profilaktyce (FP, *chemoprevention*) w odniesieniu do raka płuca, której celem jest zapobieganie lub odwrócenie niekorzystnych zmian w nabłonku dróg oddechowych pod wpływem palenia tytoniu. Pomimo wieloletnich badań obejmujących witaminę A i E, retinoidy, N-acetylocysteinę, kwas salicylowy i oltipraz nie potwierdzono jak dotąd skutecznej profilaktyki farmakologicznej. Stąd zainteresowanie w poszukiwaniu nowych leków wywierających swój efekt na poziomie zaburzeń molekularnych w przebiegu kancero-

genezy, co wiąże się z planowaniem projektów badawczych z udziałem dużej liczby uczestników i rolą bronchoskopii autofluorescencyjnej w procesie monitorowania efektów chemoprewencji [8, 19, 20].

## Podsumowanie

Prace z wykorzystaniem bronchoskopii autofluorescencyjnej pokazują, że jest to badanie już uznane, mające swoje miejsce wśród metod diagnostycznych w bronchologii. Należy jednak zachować daleko idącą ostrożność w interpretacji zmian, których weryfikacja jest możliwa zarówno poprzez oglądanie w świetle białym, jak i ocenę histologiczną pobranych bioptatów. Na ostateczne rozpoznanie zmian patologicznych, szczególnie o charakterze nowotworzenia śródnamionkowego, ma wpływ zarówno doświadczenie patologa, jak i osoby wykonującej badanie, które pozwala na precyzyjne pobranie dobrej jakości bioptatów z miejsc o nieprawidłowej strukturze, zarówno w bronchoskopii konwencjonalnej, jak i autofluorescencyjnej.

## Piśmiennictwo

- Rossi A, Maione P, Colantuoni G, Gaizo FD, Guerriero C, Nicoletta D, Ferrara C, Gridelli C. Screening for lung cancer: New horizons? *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56: 311-320.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94: 153-156.
- Lycette RM, Leslie RB. Fluorescence of malignant tissue. *Lancet* 1965; 2: 436.
- Ikeda N, Honda H, Hayashi A, Usuda J, Kato Y, Tsuboi M, Ohira T, Hirano T, Kato H, Serizawa H, Aoki Y. Early detection of bronchial lesions using newly developed videoendoscopy-based autofluorescence bronchoscopy. *Lung Cancer* 2006; 52: 21-27.
- van Rens MT, Schramel FM, Elbers JR, Lammers JW. The clinical value of lung imaging fluorescence endoscopy for detecting synchronous lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 32: 13-18.
- Jassem E, Szymanowska A, Siemińska A, Jassem J. Palenie tytoniu a rak płuca. *Pneumonol Alergol Pol* 2009; 77: 469-473.
- Pierard P, Vermeylen P, Bosschaerts T, Roufousse C, Berghmans T, Sculier JP, Ninane V. Synchronous roentgenographically occult lung carcinoma in patients with resectable primary lung cancer. *Chest* 2000; 117: 779-785.
- Weigel TL, Kosco PJ, Dacic S, Rusch VW, Ginsberg RJ, Luketich JD. Postoperative fluorescence bronchoscopic surveillance in non-small cell lung cancer patients. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 967-970.
- Kennedy TC, Miller Y, Prindiville S. Screening for lung cancer revisited and the role of sputum cytology and fluorescence bronchoscopy in a high-risk group. *Chest* 2000; 117 (4 Suppl 1): 72S-79S.
- Banerjee AK. Preinvasive lesions of the bronchus. *J Thorac Oncol* 2009; 4: 545-551.
- Häussinger K, Becker H, Stanzel F, Kreuzer A, Schmidt B, Strausz J, Cavaliere S, Herth F, Kohlhäufel M, Müller KM, Huber RM, Pichlmeier U, Bolliger CH. Autofluorescence bronchoscopy with white light bronchoscopy compared with white light bronchoscopy alone for the detection of precancerous lesions: a European randomised controlled multicentre trial. *Thorax* 2005; 60: 496-503.
- Sato M, Sakurada A, Sagawa M, Minowa M, Takahashi H, Oyaizu T, Okada Y, Matsumura Y, Tanita T, Kondo T. Diagnostic results before and after introduction of autofluorescence bronchoscopy in patients suspected of having lung cancer detected by sputum cytology in lung cancer mass screening. *Lung Cancer* 2001; 32: 247-253.
- Paris C, Benichou J, Bota S, Sagnier S, Metayer J, Eloy S, Auliac JB, Nouvet G, Thiberville L. Occupational and nonoccupational factors associated with high grade bronchial pre-invasive lesions. *Eur Respir J* 2003; 21: 332-341.
- Kennedy TC, Lam S, Hirsch FR. Review of recent advances in fluorescence bronchoscopy in early localization of central airway lung cancer. *Oncologist* 2001; 6: 257-262.
- Kennedy TC, McWilliams A, Edell E, Sutedja T, Downie G, Yung R, Gazdar A, Mathur PN; American College of Chest Physicians. Bronchial intraepithelial neoplasia/early central airways lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2<sup>nd</sup> edition). *Chest* 2007; 132 (3 Suppl): 221-223.
- Bota S, Auliac JB, Paris C, Métayer J, Sesboué R, Nouvet G, Thiberville L. Follow-up of bronchial precancerous lesions and carcinoma in situ using fluorescence endoscopy. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1688-1693.
- Kato H. Photodynamic therapy for lung cancer – a review of 19 years' experience. *J Photochem Photobiol B* 1998; 42: 96-99.
- Hoshino H, Shibuya K, Chiyo M, Iyoda A, Yoshida S, Sekine Y, Iizasa T, Saitoh Y, Baba M, Hiroshima K, Ohwada H, Fujisawa T. Biological features of bronchial squamous dysplasia followed up by autofluorescence bronchoscopy. *Lung Cancer* 2004; 46: 187-196.
- Pendyala L, Schwartz G, Bolanowska-Higdon W, Hitt S, Zdanowicz J, Murphy M, Lawrence D, Creaven PJ. Phase I/pharmacodynamic study of N-acetylcysteine/oltpiraz in smokers: early termination due to excessive toxicity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 269-272.
- Lam S, Xu X, Parker-Klein H, Le Riche JC, Macaulay C, Guillaud M, Coldman A, Gazdar A, Lotan R. Surrogate end-point biomarker analysis in a retinol chemoprevention trial in current and former smokers with bronchial dysplasia. *Int J Oncol* 2003; 23:1607-1613.